



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 50 124.9

Anmeldetag: 11. Oktober 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verwendung der Acetylaminosäureacemase aus
Amycolatopsis orientalis zur Racemisierung von
Carbamoylaminosäuren

IPC: C 12 P 13/04

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 9. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Brand

Verwendung der Acetylaminosäureracemase aus *Amycolatopsis orientalis* zur Racemisierung von Carbamoylaminosäuren

Die vorliegende Erfindung richtet sich auf die Verwendung einer N-Acetylaminosäureracemase (AAR) in einem Verfahren zur Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren.

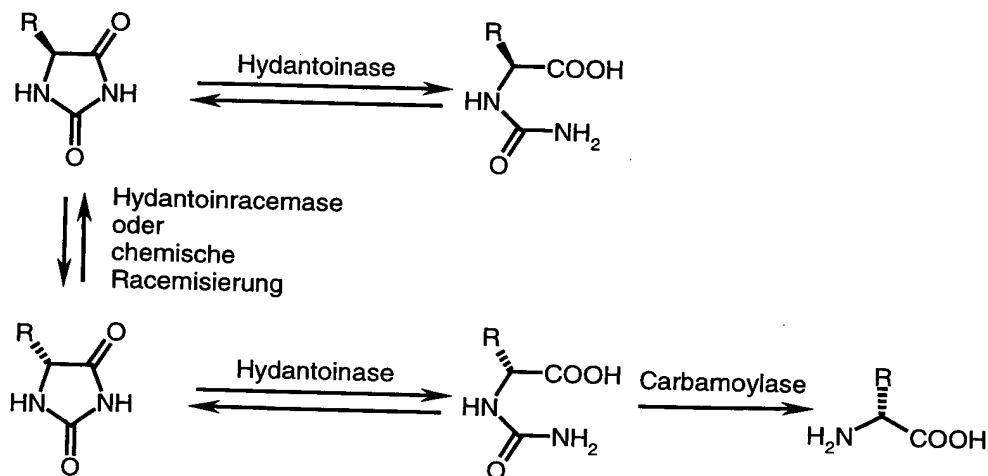
Optisch reine Aminosäuren sind für die chemische Synthese sowie die parenterale Ernährung wichtige Ausgangsstoffe. Zur Herstellung optisch reiner Aminosäuren sind dem Fachmann viele Möglichkeiten bekannt. U.a. bieten sich diesbezüglich enzymatische Verfahren an, da sie zum einen katalytisch arbeiten und zum anderen die Aminosäuren mit sehr hohen Enantiomerenanreicherungen herzustellen gestatten.

Ein bekanntes enzymatisches Verfahren geht dabei von racemischen Hydantoinen aus, welche mittels Hydantoinasen in N-carbamoylgeschützte Aminosäuren transformiert werden. Anschließend werden diese durch Carbamoylasen in die Aminosäuren umgesetzt.

Vorzugsweise erfolgt die Trennung der in dieser Reaktionssequenz auftretenden Racemate auf der Basis der N-carbamoylgeschützten Aminosäuren, da sowohl L- als auch D-selektive Carbamoylasen zur Verfügung stehen (Park et al., Biotechnol. Prog. 2000, 16, 564-570; May et al., Nat Biotechnol. 2000, 18, 317-20; Pietzsch et al., J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 2000, 737, 179-86; Chao et al., Biotechnol. Prog. 1999, 15, 603-7; Wilms et al., J. Biotechnol. 1999, 68, 101-13; Batisse et al., Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 763-6; Buson et al., FEMS Microbiol. Lett. 1996, 145, 55-62).

Um einen vollständigen Umsatz der eingesetzten Hydantoine in optisch reine Aminosäuren zu gewährleisten, geschieht die dazu notwendige Racemisierung bisher auf der Basis der Hydantoine in chemischer oder enzymatischer Art und Weise (EP 745678; EP 542098; Schema 1).

Schema 1:



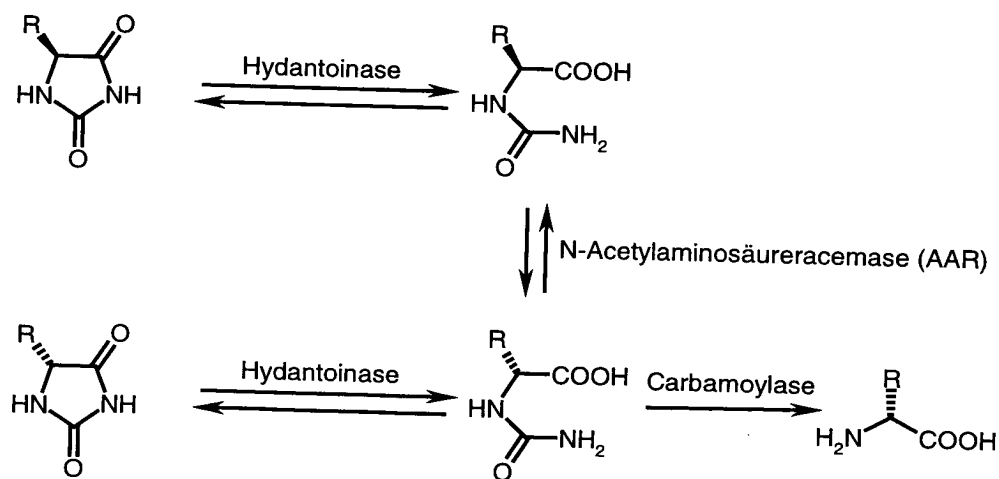
- Aus *Streptomyces atratus* Y-53 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40, 835-840) und *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995a, 42, 853-859) sowie *Amycolatopsis orientalis* sp. lurida (DE19935268) sind N-Acetylaminosäureracemasen (AARs) bekannt. Von der TS-1-60 ist eine allerdings sehr geringe Aktivität bei N-carbamoylgeschützten Aminosäuren feststellbar. Darüberhinaus besitzt dieses Enzym den Nachteil einer sehr hohen Metallionenabhängigkeit, was für den Einsatz dieses Enzyms in einem großtechnischen Prozeß nachteilig erscheint.
- Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, die Verwendung einer N-Acetylaminosäureracemase zur gegenüber dem Stand der Technik verbesserten Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren anzugeben. Diese Racemase sollte in einem Verfahren zur Herstellung von optisch reinen Aminosäure ausgehend von racemischen Hydantoinen großtechnisch vorteilhaft einsetzbar sein.
- Gelöst wird diese Aufgabe durch die Verwendung der AAR gemäß Anspruch 1. Ansprüche 2 und 3 richten sich auf bevor-

zugte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Racemisierungsverfahrens.

Dadurch, daß man in einem Verfahren zur Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren eine N-Acetylaminosäureracemasen (AAR) aus *Amycolatopsis orientalis subspecies lurida* (Seq. 2) verwendet, erhält man aufgrund der überraschend erhöhten Aktivität der erfindungsgemäß eingesetzten AAR gegenüber der TS-1-60 im Hinblick auf die Racemisierung von N-Carbamoylaminosäuren die Möglichkeit, in einem verbesserten Verfahren die Äquilibrierung optischer Antipoden von N-carbamoylgeschützten Aminosäuren zu vollziehen.

Dies ist vor dem Hintergrund besonders vorteilhaft, daß man somit einen weiteren enzymatischen Schritt in einem Verfahren zur Herstellung von optisch reinen Aminosäuren etablieren kann, welches von Hydantoinen ausgeht (Schema 2).

Schema 2:



Gegenüber den literaturbekannten enzymatischen Verfahren, welche über eine enzymatische oder ggf. stressende chemische Racemisierung der Hydantoine prozessieren (Schema 1), hat man somit eine weitere vorteilhafte Möglichkeit geschaffen, aus racemischen Hydantoinen optisch reine Aminosäuren zu generieren.

Vorzugsweise wird für das Racemisierungsverfahren die rekombinant hergestellte Variante der AAR aus *Amycolatopsis* o. sp. *lurida* gemäß DE19935268 eingesetzt. Aus der DE19935268 ist bekannt, daß diese eine verhältnismäßig geringe Schwermetallionenabhängigkeit (insbesondere in Bezug auf Kobaltionen) und geringe Aminosäureinhibierung aufweist. Dort wird auch deren Generierung als rekombinantes Enzym erläutert.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird wie gesagt in einem Gesamtprozeß zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten ausgehend von Hydantoinen oder N-Carbamoylaminosäuren vorteilhaft eingesetzt. Man geht dabei im Falle der Hydantoine bevorzugt so vor, daß man racemische Hydantoine mittels Hydantoinasen in die korrespondierenden racemischen N-Carbamoylaminosäuren spaltet und diese anschließend durch L- oder D-spezifische Carbamoylasen in die optisch aktiven L- oder D-Aminosäuren umwandelt. Damit sich nicht die nicht umgesetzte optische Antipode einer N-Carbamoylaminosäure im Reaktionsgemisch anreichert, setzt man die optischen Antipoden der N-Carbamoylaminosäuren durch Zugabe der AAR erfindungsgemäß ins Gleichgewicht und kann somit ebenfalls das racemische Hydantoin zur Gänze in optisch reine Aminosäuren umwandeln.

Vorzugsweise erfolgt dieser Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor (DE 199 10 691.6).

Die genannten Enzyme können in freier Form als homogen aufgereinigte Verbindungen oder als rekombinant hergestellte Enzyme zusammen oder nacheinander verwendet werden. Weiterhin können die Enzyme auch als Bestandteil eines Gastorganismus (Ganzzellkatalysator wie in US09/407062) eingesetzt werden oder in Verbindung mit der aufgeschlossenen Zellmasse des Wirtsorganismus. Möglich ist ebenfalls die Verwendung der Enzyme in immobilisierter Form (Bhavender P. Sharma, Lorraine F. Bailey and Ralph A. Messing, "Immobilisier-

te Biomaterialien - Techniken und Anwendungen", Angew. Chem. 1982, 94, 836-852). Vorteilhafterweise erfolgt die Immobilisierung durch Lyophilisation (Dordick et al. J. Am. Chem. Soc. 194, 116, 5009-5010; Okahata et al. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 1971-1974; Adlercreutz et al. Biocatalysis 1992, 6, 291-305). Ganz besonders bevorzugt ist die Lyophilisation in Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen, wie Aerosol OT oder Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol (PEG) oder Brij 52 (Diethylenglycol-mono-cetyler) (Goto et al. Biotechnol. Techniques 1997, 11, 375-378).

Der Mikroorganismus *Amocolatopsis orientalis* subsp. *lurida* ist unter der Nummer DSM43134 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen hinterlegt.

15 Unter AAR wird im Rahmen der Erfindung sowohl das native wie auch das rekombinant hergestellte Enzym verstanden.

Der Begriff enantiomer angereichert bezeichnet das Vorliegen einer optischen Antipode im Gemisch mit der anderen in >50%.

20 Unter Aminosäure wird im Rahmen der Erfindung eine natürliche oder unnatürliche α -Aminosäure verstanden, d.h. daß der am α -C-Atom der α -Aminosäure befindliche Rest sich von einer natürlichen Aminosäure, wie in Beyer-Walter, Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22.

25 Auflage, 1991, S.822f. dargestellt, ableiten kann oder darüberhinaus auch von entsprechenden α -Resten unnatürlicher α -Aminosäuren, welche z.B. in DE19903268.8 aufgeführt sind.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Verwendung einer Acetylaminosäureracemase zur
Racemisierung von Carbamoylaminosäuren

<130> 000337 AM

10 <140>
<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1107

<212> DNA

20 <213> Amycolatopsis orientalis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1107)

25

<400> 1

gtg aaa ctc agc ggt gtg gaa ctg cgc cgg gtc cgg atg ccg ctc gtg 48
Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
1 5 10 15

30

gcc ccg ttc cgg acg tcg ttc ggg acg cag tcc gag cgg gaa ttg ctg 96
Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
20 25 30

35

ctg gtc cgc gcg gtg acc ccg gcg ggc gag ggc tgg ggc gaa tgt gtc 144
Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
35 40 45

40

gcg atg gag gcg ccg ctc tac tcg tcg gag tac aac gac gcc gcc gag 192
Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
50 55 60

45

cac gtg ctg cgg aac cat ctg atc ccc gca ctg ctg gcg gcc gag gac 240
His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80

50

gtg acc gcg cac aag gtg acg ccg ttg ctg gcg aag ttc aag ggc cac 288
Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
85 90 95

cgg atg gcg aag ggc gcg ctg gag atg gcg gtc ctc gac gcc gaa ctc 336
Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
100 105 110

55

cgc gcg cat gac cgg tcc ttc gcg gcc gag ctg ggg tcc act cgc gac 384
Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
115 120 125

tcc gtg gcc tgc ggg gtc tcg gtc ggg atc atg gac tcg atc ccg cac 432

	Ser	Val	Ala	Cys	Gly	Val	Ser	Val	Gly	Ile	Met	Asp	Ser	Ile	Pro	His	
	130						135					140					
5	ctg	ctc	gac	gtc	gtc	ggc	ggc	tac	ctc	gac	gag	ggc	tac	gtc	cgg	atc	480
	Leu	Leu	Asp	Val	Val	Gly	Gly	Tyr	Leu	Asp	Glu	Gly	Tyr	Val	Arg	Ile	
	145					150					155					160	
10	aag	ctg	aag	atc	gag	ccc	ggc	tgg	gac	gtc	gag	ccg	gtc	cgg	cag	gtg	528
	Lys	Leu	Lys	Ile	Glu	Pro	Gly	Trp	Asp	Val	Glu	Pro	Val	Arg	Gln	Val	
					165					170					175		
15	cgt	gag	cgc	ttc	ggt	gac	gac	gtg	ctg	ctg	cag	gtc	gac	gcg	aac	acc	576
	Arg	Glu	Arg	Phe	Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Leu	Gln	Val	Asp	Ala	Asn	Thr	
					180				185					190			
	gcg	tac	acg	ctg	ggc	gac	gcg	ccc	ctg	ctg	tcc	cgg	ctc	gac	ccg	ttc	624
	Ala	Tyr	Thr	Leu	Gly	Asp	Ala	Pro	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Asp	Pro	Phe	
			195					200					205				
20	gac	ctg	ctg	ctg	atc	gag	cag	ccg	ctc	gaa	gaa	gag	gac	gtg	ctc	ggc	672
	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	Glu	Gln	Pro	Leu	Glu	Glu	Glu	Asp	Val	Leu	Gly	
							215					220					
25	cac	gcc	gag	ctg	gcc	aag	cgg	atc	cgg	acg	ccg	atc	tgc	ctc	gac	gag	720
	His	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	Ile	Arg	Thr	Pro	Ile	Cys	Leu	Asp	Glu	
	225					230					235					240	
30	tcg	atc	gtc	tcg	gcc	aag	gcc	gcc	gcg	gac	gcg	atc	aag	ctc	ggc	gcc	768
	Ser	Ile	Val	Ser	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ile	Lys	Leu	Gly	Ala	
					245					250					255		
35	tgc	cag	atc	gtc	aac	atc	aaa	ccg	ggc	cgg	gtc	ggc	gga	tac	ctc	gaa	816
	Cys	Gln	Ile	Val	Asn	Ile	Lys	Pro	Gly	Arg	Val	Gly	Gly	Tyr	Leu	Glu	
				260					265					270			
	gcc	cgc	cgg	gtg	cac	gac	gtc	tgc	gcg	gca	cac	ggg	atc	gcg	gtg	tgg	864
	Ala	Arg	Arg	Val	His	Asp	Val	Cys	Ala	Ala	His	Gly	Ile	Ala	Val	Trp	
			275					280					285				
40	tgc	ggc	ggg	atg	atc	gag	acc	ggg	ctc	ggc	cgg	gcg	gcc	aac	gtc	gca	912
	Cys	Gly	Gly	Met	Ile	Glu	Thr	Gly	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala	Asn	Val	Ala	
		290				295					300						
45	ctg	gcc	tcg	ctg	ccc	ggc	ttc	acg	ctg	ccg	ggg	gac	acc	tcg	gcg	tcc	960
	Leu	Ala	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Thr	Leu	Pro	Gly	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	
	305					310					315					320	
50	ggc	cgg	ttc	tat	cgc	acc	gac	atc	acc	gag	ccg	ttc	gtg	ctg	gac	gcc	1008
	Gly	Arg	Phe	Tyr	Arg	Thr	Asp	Ile	Thr	Glu	Pro	Phe	Val	Leu	Asp	Ala	
					325					330					335		
55	ggg	cat	ctg	ccg	gtg	ccg	acc	ggg	ccg	ggc	ctc	ggg	gtg	act	ccg	att	1056
	Gly	His	Leu	Pro	Val	Pro	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Gly	Val	Thr	Pro	Ile	
				340					345					350			
	ccg	gat	ctt	ctg	gac	gag	gtc	acc	acg	gag	aaa	gcg	tgg	atc	ggg	tcg	1104
	Pro	Asp	Leu	Leu	Asp	Glu	Val	Thr	Thr	Glu	Lys	Ala	Trp	Ile	Gly	Ser	
			355					360					365				

tag

1107

5 <210> 2
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis orientalis

10 <400> 2
 Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
 1 5 10 15
 Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
 20 25 30
 15 Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
 35 40 45
 Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
 50 55 60
 20 His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
 85 90 95
 Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
 100 105 110
 25 Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
 115 120 125
 Ser Val Ala Cys Gly Val Ser Val Gly Ile Met Asp Ser Ile Pro His
 130 135 140
 30 Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile
 145 150 155 160
 Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val
 165 170 175
 Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr
 180 185 190
 35 Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe
 195 200 205
 Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Glu Asp Val Leu Gly
 210 215 220
 40 His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala
 245 250 255
 Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu
 260 265 270
 45 Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp
 275 280 285
 Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala
 290 295 300
 50 Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala
 325 330 335
 Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile
 340 345 350
 55 Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly Ser
 355 360 365

Beispiele:

Nachweis der Racemaseaktivität des rekombinanten AAR- Enzyms

Das Substratspektrum der N-Acetylaminosäureracemase aus *A-mycolatopsis orientalis subsp. lurida* wurde mit dem unten
5 beschrieben Enzymassay getestet.

Der Assay setzte sich wie folgt zusammen:

Puffer Tris/HCl	50 mM (pH 8,0)
10 Substrat	25 mM
Cobaltchlorid	6 mM
AAR	ca. 150 µg gereinigtes Protein
Endvolumen	1 ml

Im Assay wurden enantiomerenreine Aminosäure-Derivate eingesetzt und die Bildung des entsprechenden Racemats im Polarimeter (Perkin-Elmer 241) verfolgt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C (heizbare Küvette) für 3 bis 12 Stunden.
15 Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm.

20

Tabelle 1: Auflistung der getesteten Substrate und der entsprechenden spezifischen Aktivität der AAR.

Substrat	Spezifische Aktivität
<i>N</i> -Carbamoyl-D-Met	155 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-D-Phe	20 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Abs	15 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Leu	20 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Met	118 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Tyr	62 mU/mg
<i>N</i> -Carbamoyl-L-Val	20 mU/mg

5

Die *N*-Acylaminosäureracemase aus *A. TS-1-60* besitzt mit *N*-Carbamoyl-D-Met als Substrat eine Aktivität von 100 mU/mg. Damit ist diese spezifische Aktivität um 35% niedriger, als die der Racemase aus *A. orientalis subsp. lurida*.

Patentansprüche:

1. Verwendung von N-Acetylaminosäureracemasen (AAR) aus *Amycolatopsis orientalis subspecies lurida* in einem Verfahren zur Racemisierung von N-Carbamoyl-aminosäuren.
5
2. Verwendung nach Anspruch 1 in einem Prozeß zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten ausgehend von Hydantoinen oder N-Carbamoylaminosäuren.
- 10 3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor durchführt.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung ist auf die Verwendung der N-Acetylaminosäureracemase aus *Amocolatopsis orientalis* subspecies *lurida* zur Racemisierung von N-
5 Carbamoylaminosäuren gerichtet.

Diese Verwendung erlaubt die 100%-ige Herstellung von optisch reinen Aminosäuren ausgehend von racemischen Hydantoinen in einem enzymatischen Gesamtverfahren.